

522 370  
PCT/PTO 25 JAN 2005

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
5. Februar 2004 (05.02.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/011019 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61K 38/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/008205

(22) Internationales Anmeldedatum:  
25. Juli 2003 (25.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 33 929.5 25. Juli 2002 (25.07.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): CHARITE-UNIVERSITÄTS MEDIZIN BERLIN  
[DE/DE]; Schumannstrasse 20/21, 10117 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STANGL, karl  
[DE/DE]; Ballenstedter Str. 12, 10709 Berlin (DE).  
MEINERS, Sike [DE/DE]; Essener Str.2, 10555 Berlin  
(DE). HOCHER, Berthold [DE/DE]; Ernst-Thäl-  
mann-Str. 151 a, 14532 Kleinmachnow (DE).

(74) Anwalt: KRAUSS, Jan, B.; Boehmert & Boehmert, Pet-  
tenkoferstrasse 20-22, 80336 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,  
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF A PROTEASOME INHIBITOR IN THE TREATMENT OF FIBROTIC DISEASES

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINES PROTEASOM-INHIBITORS ZUR BEHANDLUNG FIBROTISCHER ERKRAN-  
KUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to the use of at least one proteasome inhibitor, preferably in the form of a threonine protease inhibitor, in the treatment of fibrotic diseases, especially fibrotic diseases of the cardiovascular system.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung bezieht sich auf die Verwendung mindestens eines ProteasomInhibitors, vorzugsweise in Form eines Threoninproteaseinhibitors, zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen, insbesondere des kardiovaskulären Systems.

WO 2004/011019 A1

## **Verwendung eines Proteasom-Inhibitors zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen**

- 5 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung mindestens eines Proteasom-Inhibitors zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen insbesondere des kardiovaskulären Systems.

Die Myokardfibrose ist eine Antwort auf die Überlastung des Herzmuskels, welche beispielsweise durch Bluthochdruck, Herzinfarkt oder Kardiomyopathien verursacht wird. Zu diesem Phänomen tragen zahlreiche pathophysiologische Mechanismen bei, wie etwa die Proliferation von Herzbindegewebszellen, die zu einer erhöhten Matrixbildung führen. Funktionelle Endzustände sind die Massenzunahme des Herzmuskels und ein verstärkter bindegewebiger Umbau (Fibrose).

10 Ein Kennzeichen des Umbaus am Herzen ist somit die interstitielle Fibrose, welche zu einer erhöhten Steifheit der Herzwände führt. Dies mündet funktionell in eine diastolische Dysfunktion, die die Herzmuskelschwäche weiter verschlimmern kann. Teilweise werden diese Effekte durch eine verstärkte Expression von Genen verursacht, die für extrazelluläre Matrixproteine, wie Collagen I und III, die dominanten Kollagene des Herzmuskels, kodieren.

15 20

Die zur Zeit am besten etablierte Strategie zur Verringerung der Herzfibrose besteht in der pharmakologischen Inhibierung des Renin-Angiotensin-Systems, beispielsweise durch ACE-Inhibitoren oder Angiotensin II-Blocker. Diese Substanzen haben jedoch den Nachteil, dass sie in wenigstens 5% der Fälle zu Unverträglichkeiten bei den Patienten führen. Weiterhin wirken sie nur auf die durch das Renin-Angiotensin-System vermittelte Herzfibrose und nicht auf die durch andere Agonisten wie etwa durch TGF-beta (transforming growth factor beta) oder Endothelin-1 vermittelte Entwicklung einer myokardialen Fibrose. Es besteht daher der

25

Bedarf an alternativen Methoden, die eine Herzfibrose verringern oder vermeiden können.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass eine Inhibierung des Proteasom-  
5 systems effektiv eine Herzfibrose verringern bzw. vermeiden kann, was zu einer verbesserten Herzfunktion führt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung mindestens  
eines Proteasom-Inhibitors zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen. Die fibro-  
10 tischen Erkrankungen können unterschiedlichste Organsysteme, wie Lunge, Leber, Haut, Gelenke, Skelett und/oder Drüsen betreffen. Insbesondere bezieht sie sich auf fibrotische Erkrankungen des kardiovaskulären Systems.

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist der Hauptstoffwechselweg für den Abbau  
15 von intrazellulären Proteinen in eukaryontischen Zellen, wie z.B. von Signalmediatoren, Zellzyklusproteinen und Transkriptionsfaktoren. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung des Proteasoms die zelluläre Proliferation blockiert, mit verschiedenen Signalwegen interferiert und die Genexpression beeinflusst (Lee, D. H. et al. (1998) Trends Cell Biol., 8397-403; Yu C.-L. et al. (1997) J. Biol.  
20 Chem., 272, 14017-14020; Heldin C.-H. et al. (1999) Nat. Cell Biol., 1, E195-E197 und Desterro, J. M. P. et al., (2000) Cell Mol Live Sci., 57, 1207-1219).

Als Proteasom-Inhibitoren sind zum einen niedermolekulare organische Verbindungen und zum anderen molekularbiologische Verbindungen geeignet, die vor-  
25 zugsweise im wesentlichen spezifisch das Proteasom inhibieren. Der Inhibitionstest kann beispielsweise wie bei Dahlmann B. et al. (2000) J. Mol. Biol., 303, 643-653 beschrieben durchgeführt werden. Der Begriff „im wesentlichen spezifisch“ gemäß der vorliegenden Erfindung bedeutet, dass der Inhibitor das Proteasom stärker inhibiert als andere intrazelluläre Proteasen, wie z. B. Calpain, Cathepsine oder TPPH, vorzugsweise ca. 10mal stärker, insbesondere ca. 100mal  
30 stärker, vor allem ca. 1000mal stärker inhibiert als andere intrazelluläre Proteasen.

Die Inhibitionswerte werden üblicherweise als IC<sub>50</sub> (Konzentration des Inhibitors bei 50%iger Inhibition) angegeben und miteinander verglichen. Als niedermolekulare organische Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung versteht man organische Verbindungen mit einer relativen Molmasse von kleiner gleich 1000, vorzugsweise kleiner gleich 800. Als molekularbiologische Verbindungen versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung Nukleinsäuren, insbesondere RNA oder DNA, die die Expression einer Komponente des proteasomalen Systems inhibieren, beispielsweise die Transkription oder Translation der Proteasomkodierenden Nukleinsäuren, oder Proteine, insbesondere Bindepeptide oder -proteine, gegen mindestens eine Komponente des proteasomalen Systems, vorzugsweise gegen Ubiquitin und/oder gegen das Proteasom. Beispielsweise ist die Nukleinsäure eine anti-sense-RNA oder eine Doppelstrang-RNA (dsRNA) gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz, ein Duplex-bildendes Oligonukleotid gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz und/oder ein Knock-out-Konstrukt gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz. Als Bindeproteine oder -peptide eignen sich beispielsweise Antikörper oder ihre bindeaktiven Teile, z. B. einzelkettige Antikörper (scAb) oder Fab-Fragmente, oder Derivate davon, z.B. bispezifische Antikörper, gegen mindestens eine Komponente des proteasomalen Systems. Eine Beschreibung des proteasomalen Systems und geeigneter Proteasom-Inhibitoren findet sich beispielsweise in Kisselev A. F. & Goldberg A. L. (2001) Chemistry & Biology, 8, 739-758.

Demzufolge eignen sich als Proteasom-Inhibitoren insbesondere Threoninprotease-Inhibitoren, Serinprotease-Inhibitoren und/oder Cysteinprotease-Inhibitoren, vor allem ein Peptid-Aldehyd, ein Peptid-Boronat, ein Peptid-Vinylsulfon, ein Peptid-Epoxyketon, ein Lactacystin, ein Peptid-alpha-Ketoaldehyd, ein alpha-Ketoamid, ein Indanonpeptid, ein Polyalkylenaldehyd und/oder ein Polyphenol, insbesondere ein Cathechin-3-gallat, welches z.B. aus grünem Tee gewonnen werden kann. Vor allem eignet sich der Proteasominhibitor Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132), Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-al (PSI), CEP1612, Pyrazylcarbonyl-Phe-Leu-boronat (PS-341), Dansyl-Phe-Leu-boronat (DFLB), Morpholinonaphthyla-

lanin-Leu-boronat (MG273), NIP-Leu<sub>3</sub>-vinylsulfon (NLVS), Tyr-Leu<sub>3</sub>-VS, NIP-Leu-Leu-Asn-VS, Ada-Tyr-Ahx<sub>3</sub>-Leu<sub>3</sub>-VS, Ada-Lys(Bio)-Ahx<sub>3</sub>-Leu<sub>3</sub>-VS Ac(Me)-Ile-Ile-Thr-Leu-EX (Epoxomicin), Dihydroeponemycin, Lactacystin, clasto-Lactacystin-beta-lacton (Omuralid), PS-519, Ac-Leu-Leu-Nle-al (ALLN),  
5 3,4-Dichloroisocoumarin (DCI), 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (Pefablock SC), TMC-95A, Gliotoxin, (-) Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), Ritonavir, Lovastatin, Aclacinomicin A (Aclarubicin) und/oder Cyclosporin, die alle in Kisselev A. F. & Goldberg A. L. (2001, supra) und in Fig. 3 näher beschrieben sind, und worin Z eine Benzyloxycarbonylgruppe, al eine Aldehydgruppe, VS  
10 eine Vinylsulfongruppe, NIP eine 3-Nitro-4-hydroxy-5-iodophenylacetat-Gruppe und Bio eine Biotingruppe bedeutet. Besonders bevorzugt von allen Verbindungsklassen sind Threoninproteaseinhibitoren und davon insbesondere die Verbindungen MG132, MG262, Lactacystin und/oder Epoxomicin, vor allem MG132 und/oder MG262.

15 Gemäß der vorliegenden Erfindung wurden die Auswirkungen der Proteasom-Inhibierung auf die Herzfibrose in spontan hypertensiven Ratten (SH-Ratten) studiert. Überraschenderweise wurde bei einer Langzeitbehandlung über 12 Wochen mit dem spezifischen Proteasom-Inhibitor MG132 bei einer täglichen Dosis von 1  
20 mg pro kg eine deutliche Inhibierung der Herzfibrose von ca. 40% festgestellt, wobei der Inhibitor sehr gut vertragen wurde. Die beschriebenen Effekte resultierten in einer verbesserten ventrikulären Funktion in den MG132-behandelten Tieren. In vitro wurde eine konzentrationsabhängige Inhibierung des Wachstums kardialer Fibroblasten und eine spezifische, konzentrationsabhängige Herabregu-  
25 lierung von Collagen I $\alpha$ 2 zu ca. 75% und von Collagen III $\alpha$ 1 von ca. 90% beobachtet. Obwohl bei einer systemischen Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren als Inhibitoren eines zentralen zellulären Systems Zytotoxizität zu erwarten gewesen wäre, wurden bei der beschriebenen Langzeitbehandlung keine messbaren Nebenwirkungen festgestellt, sondern im Gegenteil eine gute Verträglichkeit konsta-  
30 tiert. Somit eignen sich Proteasom-Inhibitoren in bevorzugter Weise zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen insbesondere des kardiovaskulären Systems.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher auch auf die Behandlung von Patienten mit einer fibrotischen Erkrankung, vorzugsweise einer Fibrose des kardio-  
vaskulären Systems. Dabei ist sowohl eine systemische wie lokale Applikations-  
5 form möglich.

Die folgenden Methoden und Ergebnisse mit den Figuren 1 bis 3 sollen die Erfindung beispielhaft näher beschreiben, ohne sie darauf zu beschränken.

10

#### **Beschreibung der Figuren:**

**Figur 1** beschreibt die Auswirkungen einer MG132 Behandlung von SH-Ratten auf die Herzfibrose bestimmt durch quantitative Morphometrie von Sirius-Rot-  
15 gefärbten links-ventrikulären mikroskopischen Schnitten (Abb. 1A-1C) und auf die Herzfunktion (Abb. 1D-1F).

**Figur 1A** zeigt einen repräsentativen Schnitt durch das Herz einer unbehandelten Kontroll-SH-Ratte, die eine gesteigerte myokardiale Fibrose zeigt. Das fibrotische  
20 Gewebe ist mit Sternchen beispielhaft markiert. Der Balken entspricht 20  $\mu$ m.

**Figur 1B** zeigt einen typischen Schnitt durch das Herz eines MG132 behandelten Tieres, welches eine deutlich verringerte Herzfibrose unter Inhibition des Proteasoms zeigt.

25

**Figur 1C** zeigt die quantitative Auswertung mittels computerunterstützter Bildanalyse. Dabei ergibt sich eine um ca. 40% verringerte Herzfibrose unter MG132-Behandlung. Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (standard error of mean = Standardabweichung/  
Wurzel aus n), n=7-10; \*:p<0.05.

30

**Figur 1D** zeigt die enddiastolischen Drücke (LVEDP) im linken Ventrikel der Ratten mit deutlich verringertem Druckniveau bei den MG132-behandelten Tieren. Mittelwert  $\pm$  S.E.M.,  $n=6-10$ , \*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ .

- 5 **Figur 1E** zeigt die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dp/dt_{max}$ ), die bei den MG132-behandelten Tieren deutlich höher ist. Mittelwert  $\pm$  S.E.M.,  $n=6-10$ , \*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ .

- 10 **Figur 1F** zeigt die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit ( $dp/dt_{min}$ ), die unter MG132 Behandlung um Faktor 2 höher ist. Mittelwert  $\pm$  S.E.M.,  $n=6-10$ , \*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ .

**Figur 2** zeigt die Auswirkungen von Proteasom-Inhibitoren auf die Proliferation und Kollagenexpression in primären Herzfibroblasten der Ratte.

15

**Figur 2A** zeigt die dosisabhängige Inhibierung der Proliferation durch MG132. Die Zellen wurden mit 0,1  $\mu$ M und 1  $\mu$ M MG132 oder 0,1% DMSO stimuliert und täglich gezählt. Mittelwert  $\pm$  S.E.M.,  $n=3$ .

- 20 **Figur 2B** zeigt die Quantifizierung der mRNA-Menge der Kollagene  $I\alpha 1$ ,  $I\alpha 2$  und  $III\alpha 1$  mittels „real-time“ PCR-Analyse. Unter MG132-Behandlung kommt es dosisabhängig zu einer drastischen Senkung der Expression von Kollagen  $I\alpha 2$  und  $III\alpha 1$ . Mittelwert  $\pm$  S.E.M.,  $n=2$ .

- 25 **Figur 3A und B** zeigen die chemische Struktur verschiedener Proteasom-Inhibitoren.

**Figur 4** zeigt eine real-time PCR-Analyse der Expression von MMP2 und MMP9 und der Kollagene  $I\alpha 1$ ,  $I\alpha 2$  und  $III\alpha 1$  unter basalen Bedingungen (Fig. 4C bzw.

Fig. 4D), sowie bei der Kostimulation mit MG132 und IL- $\beta$  (Fig. 4A bzw. Fig. 4B).

**Figur 5** zeigt Zymographie-Experimente zum Nachweis von aktivem MMP2 und MMP9 unter basalen Bedingungen (Fig. 5A), bzw. bei der Kostimulation mit Proteasom-Inhibitor und IL- $\beta$  (Fig. 5B).

**Figur 6** zeigt eine Bandshift-Analyse zum Nachweis von aktivem NF $\kappa$ B in Kern-extrakten nach Stimulation mit MG132 und/oder mit IL- $\beta$ .

10

## Methoden

### Methode 1: Gewinnung von Herzfibroblasten

15 Herzfibroblasten wurden aus neonatalen Wistar-Ratten durch Plattieren der Nicht-Myozyten Fraktion von neonatalen Herzen präpariert. Die Herzen wurden 2-3 Tage alten neonatalen Ratten entnommen. Ventrikuläres Gewebe wurde mit 50 mg pro ml Trypsin in Hanks-Balanced Salt Saline (HBSS) (Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-frei, Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) über Nacht bei 4°C und mit Kollagenase  
20 (0,5 mg pro ml) in Leibowitzmedium (L-15, Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) für 45 Minuten bei 37°C behandelt. Nach dem Waschen wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C vorplattiert. Die adhärenen Zellen waren hauptsächlich Herzfibroblasten, die unter Standardbedingungen in Standard-M199-Medium mit 10% Neugeborenenkalbserum, L-Glutamin und Penizillin-Streptomycin (Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) weiterkultiviert wurden. In den Experimenten  
25 wurden subkultivierte Fibroblasten der Passagen 3-7 verwendet.

### Methode 2: Proliferationstest

MG132, ALLM und MG262 wurden von Calbiochem® (San Diego, Californien,  
30 USA) gekauft und als 10 mM DMSO-Stammlösungen bereitgestellt.



Herzfibroblasten ( $5 \times 10^4$  Zellen pro ml) wurden auf 24 Lochplatten ausgesät. Adherente Zellen wurden entweder mit MG132 (0,1 und 1  $\mu$ M) oder DMSO (0,1%) in Medium mit 10% Serum stimuliert und weiter für 7 Tage kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Proliferation wurde dadurch bestimmt, dass täglich die lebenden Zellen in dreifacher Ausfertigung mittels Trypan-Blau-Ausschlußmethode gezählt wurden. Diese Methode erlaubt die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen: Der Farbstoff Trypanblau, mit dem die Zellen versetzt werden, kann nur in Zellen mit einer defekten Zellmembran eindringen, die sich daraufhin blau färben. Lebende Zellen mit einer intakten Zellmembran werden nicht angefärbt.

### **Methode 3: Histologische Bestimmung der Fibrose**

Für die pathohistologische Evaluierung wurden die Rattenherzen in Paraffin eingebettet, in 3  $\mu$ m dicke Schnitte zerteilt, einer Hämatoxylin-Eosin- und Sirius-Rot-Färbung unterworfen und wie in Hoher, B. et al., (1999), Hypertension, 3, 816-822 beschrieben, analysiert. Das Ausmaß der Herzfibrose wurde durch quantitative Morphometrie der Sirius-Rot-gefärbten Schnitte mit einem Bildanalyse-system (Quantimed 500, Image 1.61 Programm) evaluiert. Hierbei wurde das Verhältnis von rot gefärbtem Gewebe (Bindegewebe) gegen das Gesamtgewebe des Schnittes bestimmt.

### **Methode 4: RNA und RT-PCR-Analyse**

Gesamt-RNA wurde mittels Trizolreagenz (Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) extrahiert. Anschließend wurde die RNA revers transkribiert (AMF Reverse Transkriptase, Roche Biochemicals, Mannheim, Deutschland) und mit DNase behandelt (Ambion, Huntingdon, UK). Es wurden PCR-Primer für die Rattenkollagen-RNAs I $\alpha$ 1, I $\alpha$ 2, III $\alpha$ 1, für die RNAs der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) 2 und 9 und für das „housekeeping“ Gen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) mit der Primerexpresssoftwareversion 1.2 (PerkinEl-

mer/Applied Biosystems, Wellesley, MA, USA) entworfen und von TIB Molbiol, Berlin, Deutschland gekauft. Die PCR-Reaktion wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers mit SybrGreen in einem ABI PRISM 5700 Sequenzdetektor (PerkinElmer/Applied Biosystems, Wellesley, MA, USA) durchgeführt. Die relative  
5 Quantifizierung wurde mittels der vergleichenden  $C_T$ -Methode, wie vom Hersteller beschrieben, durchgeführt.

### Methode 5: Tierstudien

Altersgleiche männliche SH-Ratten wurden vom Jackson Laboratory, Maine,  
10 USA erhalten. Die Tiere wurden gemäß den internationalen Richtlinien für die Pflege und Verwendung von Labortieren gehalten. 6 Wochen alte Ratten wurden mit MG132 (1 mg pro kg Körpergewicht), 0,1% DMSO als Lösungsmittelkontrolle oder physiologischer Kochsalzlösung (n=10 pro Gruppe, tägliche intraperitoneale Injektionen) für 12 Wochen behandelt. Die Tiere wurden mit einer Hochsalzdiät gefüttert (Trinkwasser mit 2% Natriumchlorid). Der Blutdruck wurde  
15 wöchentlich mit Hilfe der Standard-Schwanzmanschetten-Methode gemessen. Die Blutwerte und Standardlabormarker der renalen und hepatischen Funktionen wurden 6 Wochen nach der Behandlung und am Ende der Studie durch Standardmethoden bestimmt. Am Ende der Studie wurden die Tiere mittels einer intraperitonealen Injektion einer 20%igen Urethanlösung (0,9 g pro kg Körpergewicht) anästhesiert und die links-ventrikulären Druckparameter wie bei Saragoca, M. et al. (1981) Hypertension, 3, 380-385 beschrieben, bestimmt. Die Organe wurden entfernt, gewogen und entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in Paraffin für die histologische Analyse eingebettet. Da keine Differenz zwischen  
20 DMSO- und salzbehandelten SH-Ratten bezüglich der oben genannten Parameter beobachtet wurde, dienten die DMSO-behandelten Tiere als Kontrolle für die MG132-Behandlung.

Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. bestimmt, sofern nichts anderes vermerkt wurde. Die Signifikanz der Differenz in den links-ventrikulären Druckparametern und in der Quantifizierung der Herzfibrose wurden nach dem Student's  
30

T-Test bestimmt. Für den Zellproliferationstest wurde die Signifikanz durch Vergleich der Regressionskoeffizienten von MG132 gegen die Kontrollgruppe gemessen. Eine Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als signifikant erachtet. Für alle statistischen Kalkulationen wurde die SPSS 9.0 Software benutzt.

5

### Ergebnisse

Die Behandlung von spontan hypertensiven Ratten mit dem spezifischen Proteasom-Inhibitor MG132 über 12 Wochen wurde im Allgemeinen über diesen langen Zeitraum gut vertragen. In nach 6 Wochen und am Ende der Studie genommenen  
10 Blutproben wurden keine Veränderungen im Differentialblutbild oder eine Veränderung der Labormarker, die Nebenwirkungen der Niere oder Leber zeigen, beobachtet. Darüber hinaus zeigten die MG132-behandelten Tiere keine signifikante Änderung im systolischen Blutdruck und im Herzgewicht (Tabelle 1).

15 **Tabelle 1**

	Kontrolle	1 mg/kg MG132
Systolischer BD (mm Hg)	196,75±9,1	191,43±11,2
20 Körpergewicht (g)	286±36,6	280±15,3
Herzgewicht (g)	1,28±0,07	1,18±0,07
HG/KG(mg/g)	4,64±0,61	4,1±0,34

BD steht für Blutdruck; KG für Körpergewicht und HG für Herzgewicht

25

Wie aus den Figuren 1A bis 1C ersichtlich ist, zeigten MG132 behandelte SH-Ratten eine deutliche Reduktion (-38%) der Herzfibrose verglichen mit den Kontrolltieren bestimmt durch quantitative Morphometrie von Sirius-Rot gefärbten Sektionen der linken Ventrikel.

30

Die Prävention der Herzfibrose in MG132-behandelten SH-Ratten korrelierte gut mit der normalen links-ventrikulären Funktion, wobei die Kontrollen Anzeichen einer beginnenden links-ventrikulären Dysfunktion zeigten, wie in den Figuren 1D-1F dargestellt: Die Füllungsdrücke (LVEDP) waren deutlich niedriger, (Figur 1D:  $15 \pm 2$  versus  $5 \pm 3$  mm Hg,  $p=0,017$ ), die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit  $dp/dt_{max}$  (Figur 1E:  $8010 \pm 538$  versus  $3375 \pm 662$  mm Hg,  $p=0,003$ ) und die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit  $dp/dt_{min}$  (Abb. 1F:  $-5046 \pm 726$  versus  $-2290 \pm 422$  mm Hg/s,  $p=0,015$ ) - die Parameter der Herzinotropie und Herzlusitropie sind - waren mehr als doppelt so hoch in den MG132-behandelten SH-Ratten verglichen zu den Kontroll-SH-Ratten.

Um mögliche Mechanismen aufzuklären, wie die Proteasom-Inhibierung zu der verringerten Herzfibrose *in vivo* beitragen kann, wurden primäre Herzfibroblasten der Ratte mit Proteasom-Inhibitoren behandelt. Wie in Figur 2A dargestellt, verursachte die Behandlung von Herzfibroblasten mit 0,1 und 1  $\mu$ M MG132 eine Dosis-abhängige Inhibierung der Proliferation. Darüber hinaus wurde die RNA-Expression von Collagen  $I\alpha 2$  und  $III\alpha 1$  in dosisabhängiger Weise durch MG132 bis zu -73 % und bis zu 91% inhibiert (Figur 2B). Im Gegensatz dazu war die Collagen  $I\alpha 1$  Expression unbeeinflusst. Ein zweiter spezifischer Proteasom-Inhibitor MG262, welcher ein Boronatderivat von MG132 ist, inhibierte die Kollagenexpression ähnlich effektiv (Figur 2B) und belegt somit die Spezifität der proteasomalen Inhibition. Der Cathepsininhibitor ALLM, der als Peptid-Aldehyd (ALLM-al) strukturell verwandt mit MG132 ist, zeigte demgegenüber keine Effekte auf die Kollagenexpression (Figur 2B).

25

Die endemisch auftretenden und gesundheitspolitisch extrem wichtigen Organfibrosen (besonders Herzmuskelfibrose) sind von extremen Varianten von Fibrosebildungen in Form von Entzündungsreaktionen auf Fremdkörper völlig zu trennen (vergleiche auch Kapselbildung bei Silikonimplantaten), über die H. Rupp, P. Newrzella, H. König und B. Maisch in: „Hemmung der kardialen Fibrose durch

30

Blockierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB“ auf der 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, 19.-21. April 2001, Mannheim, berichteten.

- 5 Speziell bei der millionenfach vorkommenden, erfindungsgemäß durch die Verabreichung von Proteasom-Inhibitoren zur Prävention oder Therapie behandelbare Herzmuskelfibrosierung ist das pathophysiologische Agens die neuroendokrine Aktivierung mit der Freisetzung vasokonstriktorischer Mediatoren wie Katecholamine, Angiotensin II, Endothelin-1, TGF-beta und anderen, die im Rahmen einer globalen Überlast (z. B. chronische Druckbelastung bei arterieller Hypertension) oder einer regionalen Überlast (z. B. kompensatorische Hyperkinesie des intakten Restmyokards bei Myokardinfarkt) verstärkt liberiert werden. Neben ihren vasokonstriktorischen Eigenschaften haben diese Mediatoren massive wachstumsinduzierende Effekte im Sinne der Massenzunahme von Herzmuskelzellen und der Proliferation und vermehrten Syntheseleistung in Form von Extrazellulärmatrixbildung von kardialen Fibroblasten.
- 10
- 15

- Bei den erfindungsgemäß mit Proteasom-Inhibitoren behandelten, durch Überlastungen geschädigten fibrotischen Herzen werden in der feingeweblichen Untersuchung in der Regel keine Hinweise auf eine inflammatorische Reaktion beobachtet. Es ist wissenschaftlich gut belegt, dass diese durch Überlast induzierten kardialen Fibrosen unabhängig von der Aktivierung des inflammatorischen Transkriptionsfaktors NFκB sind und über die Signalkette des TGF-beta laufen (Siehe Kitamoto et al., Circulation 2000;102:806-12; Lijnen et al., Mol Gen Metab 2000;71:418-35). Die erfindungsgemäß durch Proteasom-Inhibitoren behandelbare kardiovaskulär relevante Fibrosierung wird folglich unabhängig von NFκB durch verschiedene Formen der Überlast mit konsekutiver neuroendokriner Aktivierung verursacht.
- 20
- 25

Diese Aussagen werden eindeutig dadurch gestützt, dass die wesentlichen Substanzgruppen, die gegen die Entwicklung einer Fibrose gerichtet sind, oder die zur Regression einer Fibrose beitragen, antagonistische Wirkungen auf spezifische vasoaktive Mediatoren haben. Gute Beispiele dafür sind Angiotensin Converting Enzyme-Inhibitoren (ACE-Hemmer), Angiotensin II Typ 1-Rezeptor Antagonisten (AT-1-Antagonisten) und Endothelin-Rezeptorantagonisten.

Andere bevorzugte Ausführungsbeispiele von erfindungsgemäß mittels Proteasom-Inhibitoren behandelbaren Organfibrosen ohne dominierende inflammatorische Komponente sind stauungsbedingte Fibrosierung der Leber, Hochdruckbedingte Fibrosierung der Nieren, Gelenkfibrosen bei Fehlstellungen.

Experimentelle Daten der vorliegenden Erfindung belegen, dass die erfindungsgemäßen anti-fibrotischen Effekte von Proteasom-Inhibitoren unabhängig von der Aktivierung des inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B sind.

1. Real-time PCR-Analyse der Expression von Kollagenen und MMP2 und 9 (Fig. 4):

Hierzu wurden kardiale Fibroblasten unter serum-freien Bedingungen 24 Stunden mit Proteasom-Inhibitoren behandelt und aus der präparierten RNA die Expression der Kollagene I $\alpha$ 1, I $\alpha$ 2 und III $\alpha$ 1 und von MMP2 und 9 mittels real-time RT-PCR bestimmt. Wie in Fig. 4C und 4D gezeigt, wurde durch die erfindungsgemäße Inhibition des Proteasoms nicht nur die Expression der Kollagene sondern auch die der MMPs deutlich inhibiert. Diese inhibitorische Wirkung der Proteasom-Inhibitoren war erfindungsgemäß unter basalen Bedingungen und ohne zusätzliche Zytokinstimulation der Zellen zu beobachten.

Um zu untersuchen, ob Proteasom-Inhibitoren auch nach Induktion der MMPs durch Stimulation mit dem NF $\kappa$ B-aktivierenden Zytokin Interleukin-1 $\beta$  (IL-

1β) diese Effekte zeigen, wurden die kardialen Fibroblasten mit IL-1β und Proteasom-Inhibitor kostimuliert.

Die IL-1β-Stimulation führte zu einer deutlichen Expressionssteigerung der MMPs, insbesondere von MMP9 (Fig. 4A). Diese MMP ist als eine durch NFκB aktivierbare und durch Zytokinbehandlung stimulierbare Protease beschrieben (Gum et al., J Biol Chem. 1996; 271:10672-80). Die gleichzeitige Gabe von Proteasom-Inhibitoren verhinderte nicht nur den IL-1β-induzierten Anstieg der Expression, sondern reduzierte überraschender Weise die Expression bis unter die DMSO-Kontrollwerte (Fig. 4A). Dies belegt die erfindungsgemäße Hemmung der Expression der MMPs durch Proteasom-Inhibierung, die zu einer stärkeren Hemmung der MMP-Expression führt als zu einer Hemmung der von IL-1β vermittelten MMP-Expression und somit unabhängig von der Hemmung der Aktivierung von NFκB ist.

Noch deutlicher konnte die erfindungsgemäße, von einer Inhibierung von NFκB unabhängige Wirkung von Proteasom-Inhibitoren bei der erfindungsgemäßen Prävention und Behandlung von fibrotischen Erkrankungen in einer Analyse der Kollagenexpression unter IL-1β Stimulation gezeigt werden (Fig. 4B).

Wie bereits von Siwik et al., (Siwik et al., Am J Physiol Cell Physiol. 2001;280:C53-C60) beschrieben, führte die IL-1β Behandlung zu einer Herabregulation der Kollagenexpression in kardialen Fibroblasten (Fig. 4B). Diese Suppression lässt sich durch negativ regulatorische NFκB-Elemente im Promotor der Kollagene, d.h. durch eine suppressorische Wirkung von aktiviertem NFκB auf die Expression der Kollagene, erklären (Kouba et al., J Immunol. 1999;162:3226-34). Die Kostimulation der Fibroblasten mit IL-1β

und mit Proteasom-Inhibitoren resultierte jedoch nicht in einer Aufhebung dieser Suppression der Kollagene durch NF $\kappa$ B, wie bei der Inhibierung der Aktivierung von NF $\kappa$ B durch Proteasomeninhibitoren zu erwarten gewesen wäre, sondern führte überraschender Weise zu einer noch stärkeren Suppression der Kollagenexpression als mit IL-1 $\beta$  alleine (Fig. 4B).

Die vorliegenden Untersuchungen belegen, dass die erfindungsgemäße Behandlung von fibrotischen Erkrankungen mittels Proteasominhibitoren unabhängig von der Inhibierung der Aktivierung von NF $\kappa$ B ist. Vorteilhafter Weise ermöglicht die Erfindung die Inhibierung der Expression von MMPs und Kollagenen bei fibrotischen Erkrankungen unabhängig von der Inhibierung der Aktivierung von NF $\kappa$ B. Vorzugsweise ermöglicht die Erfindung die Prävention und Behandlung von fibrotischen Erkrankungen, die nicht oder nicht vorrangig von NF $\kappa$ B vermittelt werden.

## 2. Zymographie zum Nachweis von aktivem MMP2 und MMP9 (Fig. 5):

Die erfindungsgemäße Inhibierung der Expression aktiver MMP2 in kardialen Fibroblasten unter basalen, d.h. nicht durch NF $\kappa$ B stimulierten, Bedingungen mittels Proteasom-Inhibitoren wurde auch in Zymographie-Experimenten bestätigt (Fig. 5). Hierzu wurden die Zellkulturüberstände nach Inkubation mit Proteasom-Inhibitoren in Abwesenheit (Fig. 5A) bzw. Anwesenheit (Fig. 5B) von IL-1 $\beta$  bezüglich ihrer Gelatinase-Aktivität mittels Zymographie untersucht.

Erfindungsgemäß wurde die MMP2-Bildung durch den Proteasom-Inhibitor bereits in Abwesenheit von IL-1 $\beta$ , d.h. unabhängig von NF $\kappa$ B, verringert (Fig.



5A). Die durch IL-1 $\beta$  induzierte MMP2- und MMP9-Aktivierung wurde durch gleichzeitige Gabe von Proteasom-Inhibitoren ebenfalls verringert (Fig. 5B).

3. Bandshift-Analyse zum Nachweis aktiven NF $\kappa$ Bs (Fig. 6):

5

Die oben dargestellten Ergebnisse belegen, dass die erfindungsgemäßen inhibitorischen Wirkungen der Proteasom-Inhibitoren auf die Kollagen- und MMP-Expression bei unstimulierten kardialen Fibroblasten auftreten und deshalb unabhängig von der Inhibierung der Aktivierung von NF $\kappa$ B sind. Dies wurde zusätzlich in Bandshift-Analysen mit Oligonukleotiden, die eine NF $\kappa$ B-DNA-Bindungsstelle aufweisen, bestätigt. Dazu wurden Kernextrakte von kardialen Fibroblasten hergestellt, die in einer Zeitreihe in An- und Abwesenheit von IL-1 $\beta$  mit 0.5  $\mu$ M MG132 bzw. DMSO (Lösungsmittelkontrolle) behandelt wurden.

15

Wie in Fig. 6 gezeigt, weisen kardiale Fibroblasten unter nicht-stimulierten, basalen Bedingungen keinen aktiven NF $\kappa$ B-Komplex auf (siehe Kontrollbanden). Unter IL-1 $\beta$ -Stimulation kommt es zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B, dargestellt als Bandshift. Die zeitgleiche Behandlung mit 0.5  $\mu$ M MG132 zeigte erst nach 6 Stunden einen leichten inhibitorischen Effekt auf NF $\kappa$ B, der die überraschend starke Verringerung der Expression von MMP2 und MMP9 bei der gleichzeitigen Gabe von MG132 und IL-1 $\beta$  (s.o. Fig. 4A) nicht zu erklären vermag. Nach 24 Stunden war eine Verringerung der durch IL-1 $\beta$ -induzierten Aktivierung von NF $\kappa$ B mit und ohne MG132 zu beobachten.

25

Die in vitro Experimente belegen somit, dass die erfindungsgemäßen inhibitorischen Effekte von Proteasom-Inhibitoren auf die Expression von Kollagenen und

MMPs unabhängig vom inflammatorischen Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B vermittelt werden.

5 Auch die eingangs dargestellten Daten zur erfindungsgemäßen Verhinderung der kardialen Fibrose im Tiermodell der spontan hypertensiven Ratten belegen die erfindungsgemäße, von Entzündungsreizen unabhängige Suppression der Kollagenexpression durch MG132: Dieses Tiermodell geht erfindungsgemäß nicht von einem Entzündungsreiz als Auslöser für die kardiale Fibrose aus, sondern von einer ausgeprägten Hypertonie der Ratten.

10

Erfindungsgemäß greifen Proteasom-Inhibitoren nicht nur inhibierend in die Kollagen- und MMP-Expression ein, sondern zeigen ihr breites Wirkspektrum auch in der Suppression der Fibroblastenproliferation.

15 Die erfindungsgemäßen therapeutischen Interventionen umfassen vorzugsweise die systemische Gabe von Proteasom-Inhibitoren. Vorzugsweise wird dabei einem Patienten wenigstens ein Proteasom-Inhibitor in einer Dosis verabreicht, in der vorteilhafter Weise systemische Nebenwirkungen, insbesondere zytotoxische Nebenwirkungen, von Proteasom-Inhibitoren nicht oder nur in geringem Maße auf-  
20 treten. Die erfindungsgemäße Verwendung von Proteasom-Inhibitoren zur Prävention und Therapie von Fibrosen ist deshalb gut verträglich, ermöglicht vorzugsweise eine spezifische anti-fibrotische Behandlung und ermöglicht somit eine erfindungsgemäße Prävention und Therapie bei einer Vielzahl von Patienten.

25 Bei bevorzugten Ausführungen ermöglicht eine erfindungsgemäße systemische Gabe wenigstens eines Proteasom-Inhibitors eine Prävention und Behandlung vorzugsweise einer kardialen Fibrose, vorzugsweise einer durch Überlast verursachten kardialen Fibrose, vorzugsweise einer durch Überlast bei chronischer

Druckbelastung bei arterieller Hypertension verursachten kardialen Fibrose, vorzugsweise einer durch Überlast bei kompensatorischer Hyperkinesie des intakten Restmyokards bei Myokardinfarkt verursachten kardialen Fibrose, vorzugsweise einer durch Überlast mit konsekutiver neuroendokriner Aktivierung verursachten kardialen Fibrose, vorzugsweise einer kardialen Fibrose, bei der eine Behandlung durch ACE-Hemmer, AT-1-Antagonisten und/oder Endothelin-Rezeptorantagonisten indiziert ist, vorzugsweise einer stauungsbedingten Fibrosierung der Leber, vorzugsweise einer Hochdruck-bedingten Fibrosierung der Nieren und vorzugsweise aller Gelenkfibrosen bei Fehlstellungen von Gelenken.

10

Bei der erfindungsgemäßen Prävention und der erfindungsgemäßen Therapie von Fibrosen wird einem Patienten wenigstens ein Proteasom-Inhibitor, vorzugsweise in einer Dosierung von in etwa 0,5 µg/kg Körpergewicht bis in etwa 0,5 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise in einer Dosierung von in etwa 1 µg/kg Körpergewicht bis in etwa 0,1 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise in einer Dosierung von in etwa 0,01 mg/kg Körpergewicht bis in etwa 0,1 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Diese Dosierungen beziehen sich auf alle hierin genannten Proteasom-Inhibitoren, insbesondere die Threoninprotease-Inhibitoren, insbesondere MG132 und MG262. Vorzugsweise wird wenigstens einer der hierin eingangs erwähnten Proteasom-Inhibitoren verabreicht, vorzugsweise MG132. Dabei werden vorzugsweise vorteilhafte Verabreichungsformen verwendet, die dem Fachmann bekannt sind, vorzugsweise feste und flüssige Arzneimittelzubereitungen, vorzugsweise Infusionslösungen, die vorzugsweise wenigstens einen vorteilhaften Arzneimittelzusatz enthalten, der dem Fachmann geläufig ist und der zur Verbesserung der Lagerfähigkeit und/oder der Verträglichkeit der Arzneimittelzubereitung beiträgt.

25

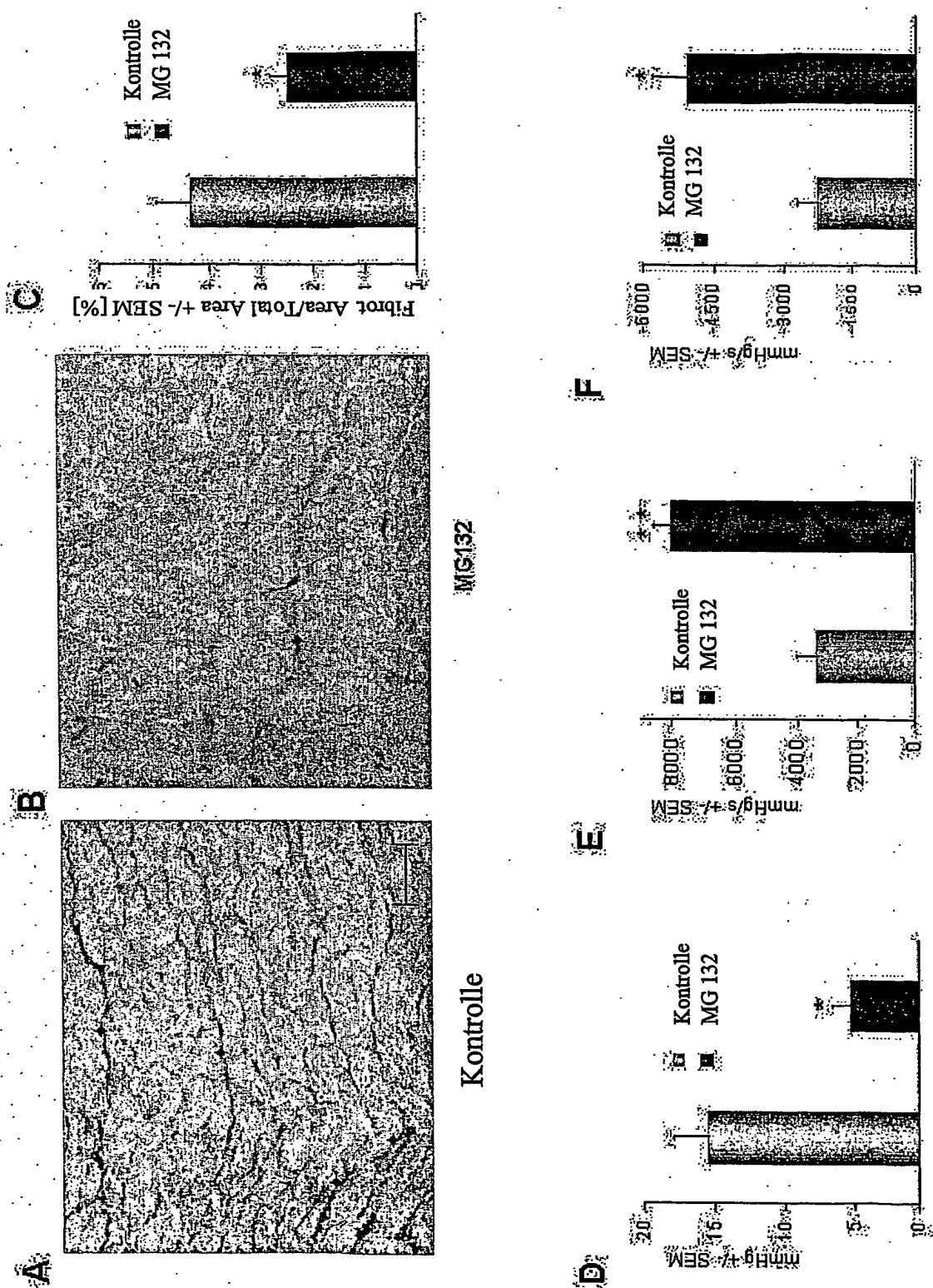
### Patentansprüche

- 5     1.     Verwendung mindestens eines Proteasom-Inhibitors zur Behandlung fibro-  
tischer Erkrankungen, die nicht durch Entzündungsreaktionen auf Fremd-  
körper verursacht sind.
- 10     2.     Verwendung nach Anspruch 1 zur Behandlung einer durch Überlast verur-  
sachten kardialen Fibrose, einer stauungsbedingten Fibrosierung der Le-  
ber, einer Hochdruck-bedingten Fibrosierung der Nieren oder einer Ge-  
lenkfibrose bei Fehlstellung eines Gelenks.
- 15     3.     Verwendung nach Anspruch 2 zur Behandlung einer durch Überlast bei  
chronischer Druckbelastung bei arterieller Hypertension verursachten kar-  
dialen Fibrose und/oder zur Behandlung einer durch Überlast bei kompensatorischer Hyperkinesie des intakten Restmyokards bei Myokardinfarkt verursachten kardialen Fibrose.
- 20     4.     Verwendung nach Anspruch 2 oder 3 zur Behandlung einer kardialen  
Fibrose, bei der eine Behandlung durch ACE-Hemmer, AT-1-  
Antagonisten und/oder Endothelin-Rezeptorantagonisten indiziert ist.
- 25     5.     Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, wobei ei-  
nem Patienten wenigstens ein Proteasom-Inhibitor in einer Dosierung von  
in etwa 0,5 µg/kg Körpergewicht bis in etwa 0,5 mg/kg Körpergewicht,  
vorzugsweise von in etwa 1 µg/kg Körpergewicht bis in etwa 0,1 mg/kg  
Körpergewicht, vorzugsweise von in etwa 0,01 mg/kg Körpergewicht bis  
in etwa 0,1 mg/kg Körpergewicht verabreicht wird.

6. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die fibrotischen Erkrankungen fibrotische Erkrankungen von Organen, vorzugsweise von Lunge, Leber, Haut, Gelenke, Skelett und/oder Drüsen betreffen, insbesondere Erkrankungen des kardiovaskulären Systems.
7. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Proteasom-Inhibitor eine niedermolekulare organische Verbindung oder eine molekularbiologische Verbindung ist.
8. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Proteasom-Inhibitor ein Threoninprotease-Inhibitor, ein Serinprotease-Inhibitor, ein Cysteinprotease-Inhibitor, ein Genexpressionsinhibitor des proteasomalen Systems und/oder ein Bindeprotein oder -peptid gegen mindestens eine Komponente des proteasomalen Systems, vorzugsweise gegen Ubiquitin und/oder gegen das Proteasom, ist.
9. Verwendung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Proteasom-Inhibitor ein Peptid-Aldehyd, ein Peptid-Boronat, ein Peptid-Vinylsulfon, ein Peptid-Epoxyketon, ein Lactacystin, ein Peptid-alpha-Ketoaldehyd, ein alpha-Ketoamid, ein Indanonpeptid, ein Polyalkylenaldehyd, ein Polyphenol, insbesondere ein Cathechin-3-gallat, eine Nukleinsäure gegen mindestens eine Komponente des proteasomalen Systems und/oder ein Antikörper oder ihre bindeaktiven Teile oder Derivate davon gegen mindestens eine Komponente des proteasomalen Systems ist.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 8-10, dadurch gekennzeichnet, dass der Proteasominhibitor Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132), Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-al (PSI), CEP1612, Pyrazylcarbonyl-Phe-Leu-boronat (PS-341), Dansyl-Phe-Leu-boronat (DFLB), Morpholinonaphthylalanin-

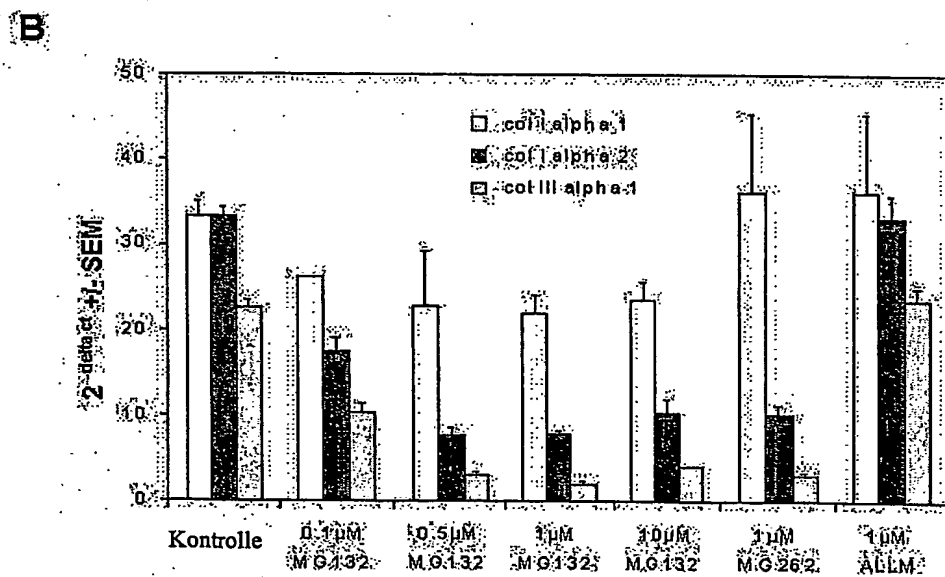
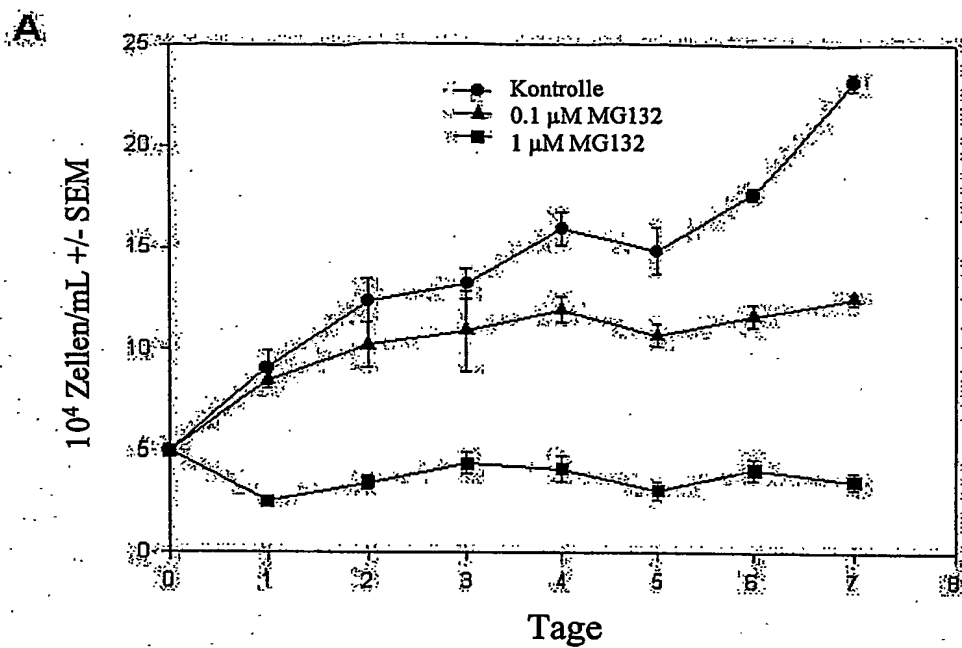
Leu-boronat (MG273), NIP-Leu<sub>3</sub>-vinylsulfon (NLVS), Tyr-Leu<sub>3</sub>-VS, NIP-Leu-Leu-Asn-VS, Ada-Tyr-Ahx<sub>3</sub>-Leu<sub>3</sub>-VS, Ada-Lys(Bio)-Ahx<sub>3</sub>-Leu<sub>3</sub>-VS Ac(Me)-Ile-Ile-Thr-Leu-EX (Epoxomicin), Dihydroeponemycin, Lactacystin, clasto-Lactacystin-beta-lacton (Omuralid), PS-519, Ac-Leu-Leu-Nle-al (ALLN), 3,4-Dichloroisocoumarin (DCI), 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (Pefablock SC), TMC-95A, Gliotoxin, (-)Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), Ritonavir, Lovastatin, Aclacinomicin A (Aclarubicin), Cyclosporin, anti-sense-RNA oder Doppelstrang-RNA (dsRNA) gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz, Triplex-bildendes Oligonukleotid gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz und/oder ein Knock-out-Konstrukt gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz ist, worin Z eine Benzyloxycarbonylgruppe, al eine Aldehydgruppe, VS eine Vinylsulfongruppe, NIP eine 3-Nitro-4-hydroxy-5-iodophenylacetat-Gruppe und Bio eine Biotingruppe bedeutet.

Fig. 1



2 / 7

Fig.2

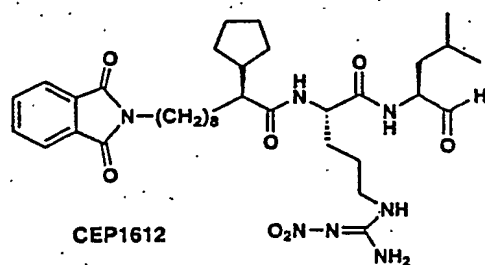
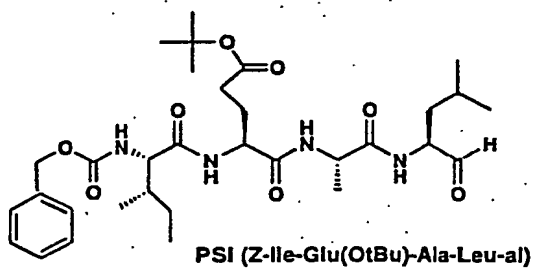
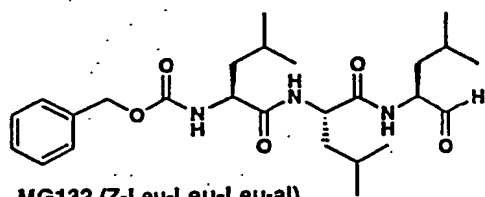




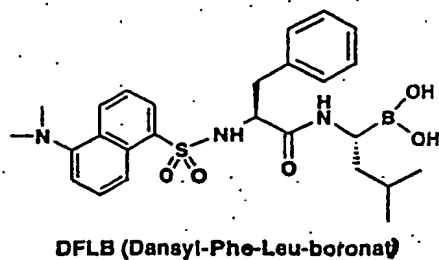
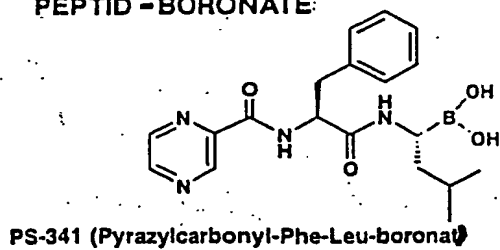
3 / 7

Fig. 3 A

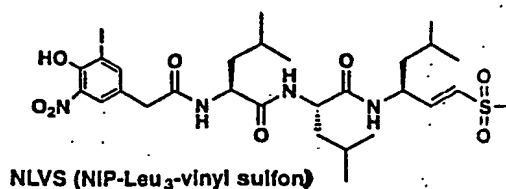
## PEPTID-ALDEHYDE



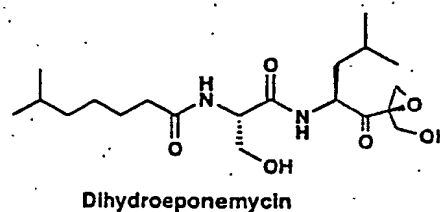
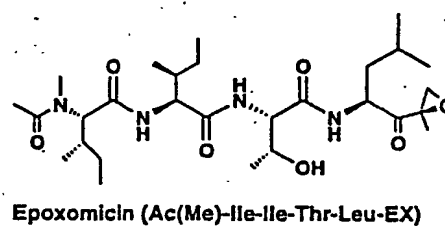
## PEPTID-BORONATE



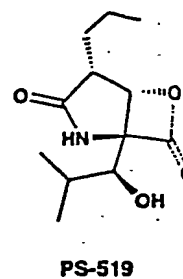
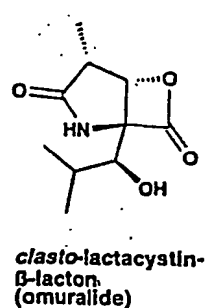
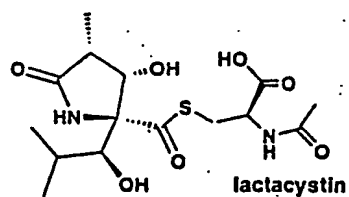
## PEPTID-VINYL SULFONE



## PEPTID-EPOXYKETONE

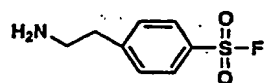
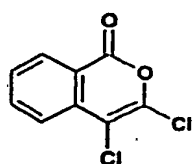
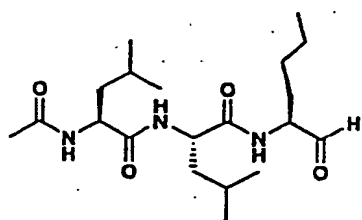
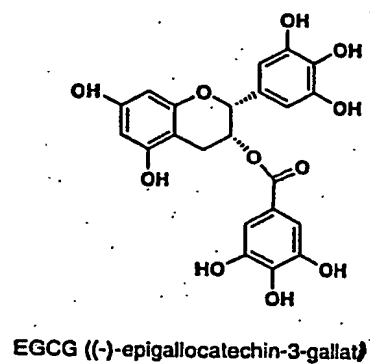
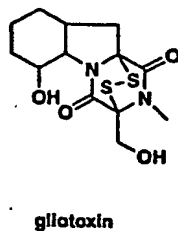
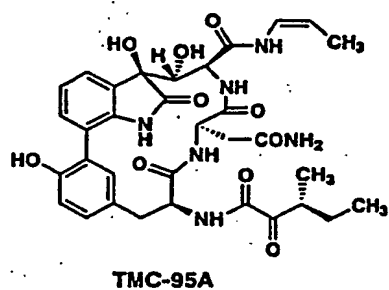


## LACTACYSTINE



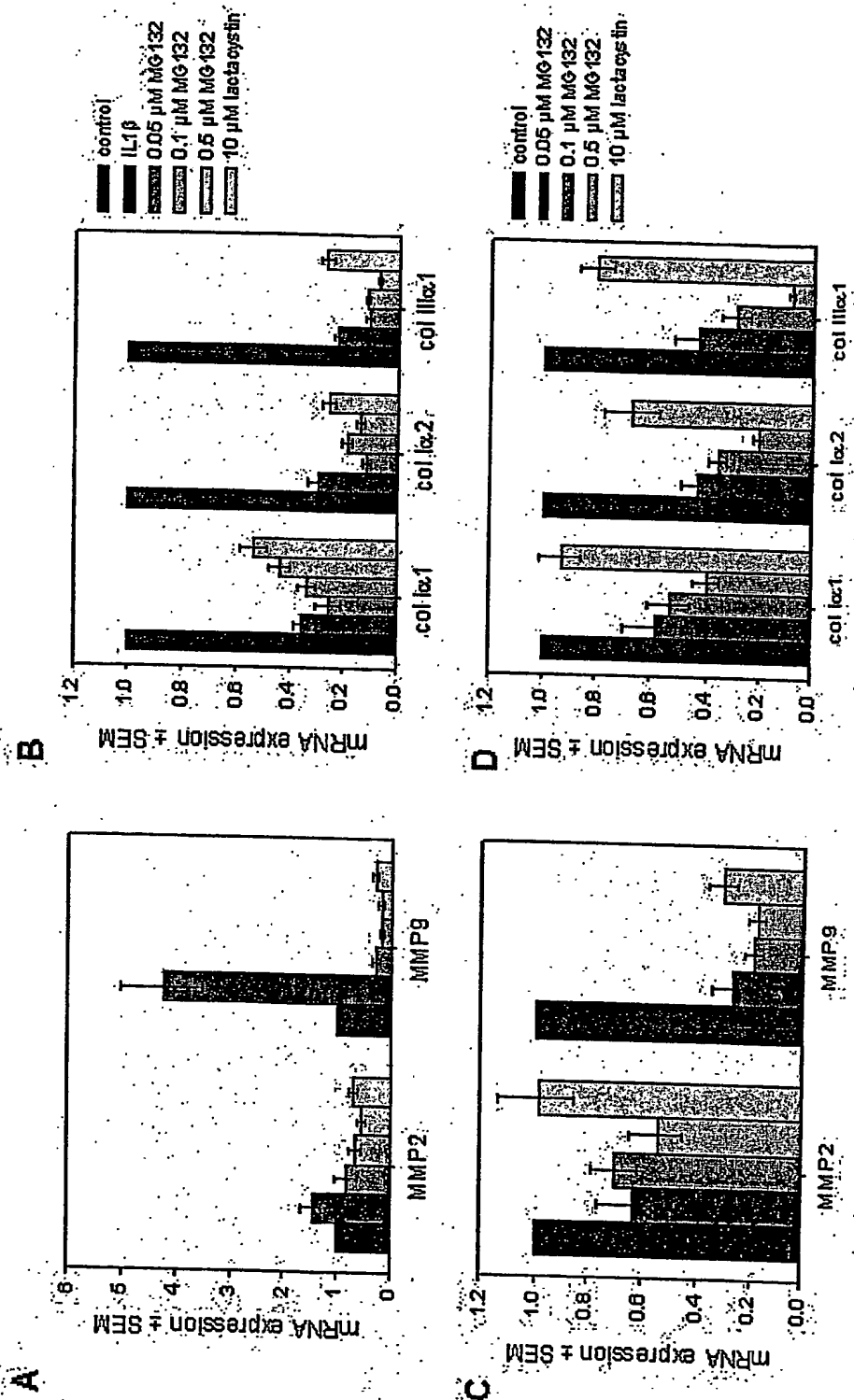
4 / 7

Fig. 3 B



5 / 7

Fig. 4



6 / 7

Fig. 5

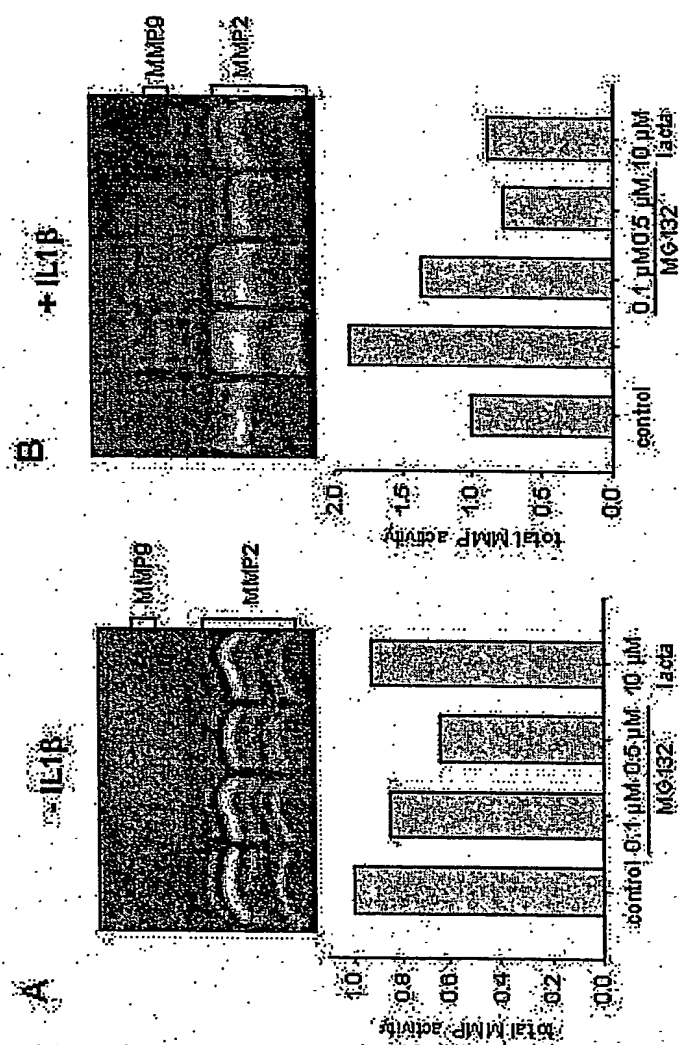
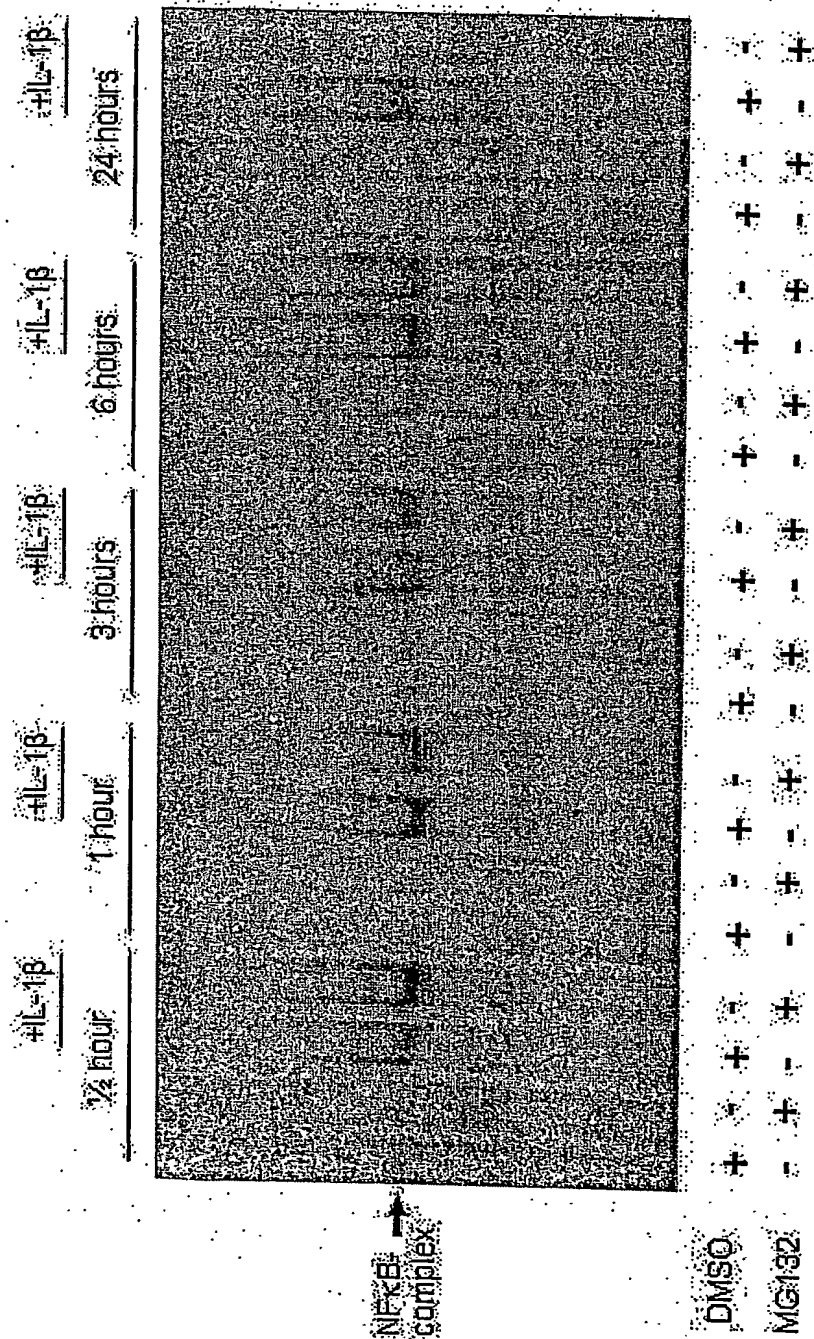


Fig. 6



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Classification No

PCT/EP 03/08205

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02 12196 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO ; SUTTON JAMES C JR (US); ZHAO GUOHUA (US);) 14 February 2002 (2002-02-14) claim 12	1-8
X	US 6 255 453 B1 (KAWABATA KAZUHI TO ET AL) 3 July 2001 (2001-07-03) column 1, line 15-35,52; claim 1	1
X	WO 98 08825 A (PROCTER & GAMBLE) 5 March 1998 (1998-03-05) page 16, paragraph 4 page 17, line 14,15; claim 9	1
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 November 2003

Date of mailing of the international search report

15/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ludwig, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.

PCT/EP 03/08205

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; June 2001 (2001-06) OKUNO MASATAKA ET AL: "Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF-beta" Database accession no. PREV200100309222 XP002262872 abstract &amp; GASTROENTEROLOGY, vol. 120, no. 7, June 2001 (2001-06), pages 1784-1800, ISSN: 0016-5085</p> <p>-----</p>	1-10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/08205

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0212196	A	14-02-2002	US 6344450 B1 AU 8064201 A CA 2418995 A1 EP 1309609 A2 WO 0212196 A2	05-02-2002 18-02-2002 14-02-2002 14-05-2003 14-02-2002
US 6255453	B1	03-07-2001	US 6001813 A US 6001814 A US 2002010315 A1 AU 4330899 A AU 4415899 A EP 1089752 A1 EP 1135151 A1 JP 2003520185 T WO 0032216 A1 WO 9962538 A1 US 2003176642 A1	14-12-1999 14-12-1999 24-01-2002 19-06-2000 20-12-1999 11-04-2001 26-09-2001 02-07-2003 08-06-2000 09-12-1999 18-09-2003
WO 9808825	A	05-03-1998	AT 231132 T AU 4073997 A AU 731319 B2 AU 4152997 A BR 9712086 A BR 9713185 A CN 1228773 A CN 1232457 A CZ 9900623 A3 CZ 9900627 A3 DE 69718480 D1 DK 925287 T3 EP 0923563 A1 EP 0925287 A1 HU 0000505 A2 HU 0000591 A2 JP 2000515166 T JP 2000516252 T KR 2000035917 A KR 2000035923 A NO 990760 A NO 990839 A NZ 334252 A NZ 334253 A PL 331856 A1 PL 331900 A1 SK 25199 A3 SK 25699 A3 TR 9900400 T2 TR 9900428 T2 WO 9808827 A1 WO 9808825 A1 US 2003186958 A1 US 6545038 B1 US 6166005 A ZA 9707694 A ZA 9707695 A	15-02-2003 19-03-1998 29-03-2001 19-03-1998 24-10-2000 03-11-1999 15-09-1999 20-10-1999 14-07-1999 14-07-1999 20-02-2003 12-05-2003 23-06-1999 30-06-1999 28-07-2000 28-04-2001 14-11-2000 05-12-2000 26-06-2000 26-06-2000 27-04-1999 28-04-1999 24-11-2000 24-11-2000 16-08-1999 16-08-1999 14-02-2000 08-10-1999 21-05-1999 21-06-1999 05-03-1998 05-03-1998 02-10-2003 08-04-2003 26-12-2000 23-02-1998 23-02-1998



# INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationale Patentzeichen

PCT/EP 03/08205

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K38/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der In Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02 12196 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO ;SUTTON JAMES C JR (US); ZHAO GUOHUA (US);) 14. Februar 2002 (2002-02-14) Anspruch 12	1-8
X	US 6 255 453 B1 (KAWABATA KAZUHI TO ET AL) 3. Juli 2001 (2001-07-03) Spalte 1, Zeile 15-35,52; Anspruch 1	1
X	WO 98 08825 A (PROCTER & GAMBLE) 5. März 1998 (1998-03-05) Seite 16, Absatz 4 Seite 17, Zeile 14,15; Anspruch 9	1
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. November 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15/12/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ludwig, G

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; Juni 2001 (2001-06) OKUNO MASATAKA ET AL: "Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF-beta" Database accession no. PREV200100309222 XP002262872 Zusammenfassung &amp; GASTROENTEROLOGY, Bd. 120, Nr. 7, Juni 2001 (2001-06), Seiten 1784-1800, ISSN: 0016-5085</p> <p>-----</p>	1-10

# INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen für selben Patentfamilie gehören

Internationales Zeichen

PCT/EP 03/08205

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0212196	A	14-02-2002	US 6344450 B1 05-02-2002
		AU 8064201 A	18-02-2002
		CA 2418995 A1	14-02-2002
		EP 1309609 A2	14-05-2003
		WO 0212196 A2	14-02-2002
US 6255453	B1	03-07-2001	US 6001813 A 14-12-1999
		US 6001814 A	14-12-1999
		US 2002010315 A1	24-01-2002
		AU 4330899 A	19-06-2000
		AU 4415899 A	20-12-1999
		EP 1089752 A1	11-04-2001
		EP 1135151 A1	26-09-2001
		JP 2003520185 T	02-07-2003
		WO 0032216 A1	08-06-2000
		WO 9962538 A1	09-12-1999
		US 2003176642 A1	18-09-2003
WO 9808825	A	05-03-1998	AT 231132 T 15-02-2003
		AU 4073997 A	19-03-1998
		AU 731319 B2	29-03-2001
		AU 4152997 A	19-03-1998
		BR 9712086 A	24-10-2000
		BR 9713185 A	03-11-1999
		CN 1228773 A	15-09-1999
		CN 1232457 A	20-10-1999
		CZ 9900623 A3	14-07-1999
		CZ 9900627 A3	14-07-1999
		DE 69718480 D1	20-02-2003
		DK 925287 T3	12-05-2003
		EP 0923563 A1	23-06-1999
		EP 0925287 A1	30-06-1999
		HU 0000505 A2	28-07-2000
		HU 0000591 A2	28-04-2001
		JP 2000515166 T	14-11-2000
		JP 2000516252 T	05-12-2000
		KR 2000035917 A	26-06-2000
		KR 2000035923 A	26-06-2000
		NO 990760 A	27-04-1999
		NO 990839 A	28-04-1999
		NZ 334252 A	24-11-2000
		NZ 334253 A	24-11-2000
		PL 331856 A1	16-08-1999
		PL 331900 A1	16-08-1999
		SK 25199 A3	14-02-2000
		SK 25699 A3	08-10-1999
		TR 9900400 T2	21-05-1999
		TR 9900428 T2	21-06-1999
		WO 9808827 A1	05-03-1998
		WO 9808825 A1	05-03-1998
		US 2003186958 A1	02-10-2003
		US 6545038 B1	08-04-2003
		US 6166005 A	26-12-2000
		ZA 9707694 A	23-02-1998
		ZA 9707695 A	23-02-1998